

# 植物葉とその分解産物における加水分解性アミノ酸構成の違い

白鳥聖也<sup>1),2)</sup>・野呂健太<sup>2),3)</sup>・岩城侑平<sup>2)</sup>・保原達<sup>4)</sup>

## Differences in composition of hydrolyzable amino acid among fresh and decomposed organic matter derived from plant leaves

Seiya SHIRATORI<sup>1),2)</sup>, Kenta NORO<sup>2),3)</sup>, Youhei IWAKI<sup>2)</sup> and Satoru HOBARA<sup>4)</sup>

(Accepted 11 July 2012)

### はじめに

生物体の成長・繁殖に不可欠なタンパク質は、主に15~20種類ほどのアミノ酸から構成される(船山2009)。そうした生物体中のタンパク質に含まれるアミノ酸(加水分解性アミノ酸)の組成は、総じて生物や種に応じた違いが特徴的に観察されている(科学技術・学術審議会2010)。

その一方で、これら生物体が分解を受けた後の有機物(分解産物)については、加水分解性アミノ酸組成について、相違点よりもむしろ類似性が指摘されてきている。山下・秋谷(1963)やSowden et al. (1977)、さらにFriedel and Scheller (2002)は、土壌の加水分解性アミノ酸について、土壌の種類によらずに非常に類似したアミノ酸組成がみとめられることを報告している。さらに、荻内ら(2000)は、複数の天然有機物の分解産物から抽出される有機物について、加水分解性アミノ酸組成が土壌から抽出される有機物に似てくることを指摘し、丸山ら(1974)が示した、微生物体が寄与しているとされる土壌有機物のアミノ酸組成とも似てくることから、微生物体(特にバクテリア体)のアミノ酸組成への収斂を示唆している。

このように、天然有機物はアミノ酸組成の点で異なるにも関わらず、土壌の分解過程で非常に似た生物学的、そして生化学的变化を受けている可能性が

みとめられる。しかしながら、こうした生化学的な類似性や収斂性、生物体とその分解過程での分解産物の変遷を解析した研究は、非常に少ない(Berg and McClaugherty 2004)。

そこで、本研究では生物体およびその分解過程の有機物を主な対象として加水分解性アミノ酸組成を分析、比較し、生物体が分解してゆく過程でのアミノ酸組成の変化、特に類似性や収斂性について検討することを主な目的とした。

### 材料と方法

本研究で比較に用いたのは、自然生態系の主要な天然有機物である植物の葉と、リター、土壌、生物の糞、土壌といった天然有機物分解残渣含有物である。これらのサンプルは、北海道洞爺湖西側の月浦付近、洞爺湖中島、そして北海道江別市野幌森林公園において採取した。これらサンプルの採取地は、ともにミズナラやイタヤカエデを上層木とする落葉樹林であった。

植物の葉は、まず月浦の森林において、ミズナラ、イタヤカエデ、ハルニレ、ハリギリ、クマイザサの5種の植物の生葉をそれぞれ3個体ずつ採取した。クマイザサについては野幌森林公園でも3個体ずつ採取した。

天然有機物分解残渣含有物サンプルについては、月浦の森林において、リター(A0層表層、A0層

<sup>1)</sup> 酪農学園大学大学院酪農学研究科修士課程水質化学研究室

Laboratory of Water Chemistry, Graduate School of Dairy Science, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

<sup>2)</sup> 2010年度酪農学園大学環境システム学部生命環境学科生態系物質循環研究室卒業生

Laboratory of Biogeochemical Cycles, Department of Biosphere and Environmental Sciences, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

<sup>3)</sup> 現在、日本衛生株式会社

Nihon Eisei Corporation

<sup>4)</sup> 酪農学園大学環境システム学部生命環境学科生態系物質循環研究室

Laboratory of Biogeochemical Cycles, Department of Biosphere and Environmental Sciences, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

下層), 土壌 (A層), ミミズ糞を3繰り返しで採取し, 洞爺湖中島においてエゾシカ糞サンプルを4塊分採取した。A0層は, 上記生葉を採取した樹木直下に堆積しているリターから, 表層と下層に分けて採取した後, A0層直下のA層を表層から深さ0~5cmほど採取した。ミミズ糞は, 月浦及び中島においてミミズをハンドソーティング法にて採取し, 密閉容器内で糞を排出させて採取した。エゾシカ糞は, 中島のエゾシカの糞をなるべく見た目が新しいものについて採取した。

全てのサンプルは, 冷蔵運搬して研究室に持ち帰った。A0層については礫及び枝などの粗大なものを取り除き, A層については2mmメッシュの篩にかけるという処置を行った。その後, 全てのサンプルは乾燥(45℃, 1週間程度)させた後, 粉碎して, アミノ酸分析に供した。

アミノ酸分析においては, 各種粉碎したサンプルを約30mg量りとり, 下記要領にて加水分解性アミノ酸濃度を測定した。まず, 量り取ったサンプルをVacuum Reaction Tubeに移し, 6M HClを3mlと12mM アスコルビン酸溶液を30μl加えた後に減圧窒素置換を行い, ヒーターブロックで110℃, 20時間の加水分解を行った。その後, 超純水(Milli-Q, Millipore社製)を加えて希釈し遠心分離機にて3,000rpmで10分の処理後, 上澄み液をエバポレーターにて乾固した。そして, 0.1M HClを加えて, 超音波洗浄機にて溶解させ, HPLC前処理用ディスクフィルター(0.45μm)にて濾過後, AccQ-Tag(Waters社製)による誘導体化を行い, 蛍光検出器を取り付けたHPLC(ポンプ: Waters 1525, 検出器: Waters 2475)を用いて各種アミノ酸の濃度を求めた。これにより求めた濃度値を重量で割った値を加水分解性アミノ酸含量とし, これをもとにアミノ酸組成比を計算した。加水分解性アミノ酸は, 16種類のアミノ酸(アラニン: Alaと表す(以下同様),

アルギニン: Arg, アスパラギン酸: Asp, グルタミン: Glu, グリシン: Gly, ヒスチジン: His, イソロイシン: Ile, ロイシン: Leu, リジン: Lys, メチオニン: Met, フェニルアラニン: Phe, プロリン: Pro, セリン: Ser, スレオニン: Thr, チロシン: Tyr, バリン: Val)について分析を行った。なお, 本報告の結果では, 各サンプルにある3~4繰り返しの平均値でアミノ酸含量, 組成%を示すこととした。

加水分解性アミノ酸については, 含量や組成を計算したほか, 組成の類似度を比較するため階層的クラスタ解析を行った。クラスタ解析はWard法を用い, 樹形図はパソコンソフトウェア(JMP 8.0, SAS Institute Japan)を用いた平方距離に基づいて作成した。

## 結果と考察

植物葉中の加水分解性アミノ酸含量は, 植物の種類により大きなばらつきが見られた(表1)。全含量(Total)はミズナラ及びクマイザサで特に高く, 逆に最も低いイタヤカエデでその2/3ほどであった。その他, 植物の種によってとくに含量の違いがあったアミノ酸としては, Asp, Glu, Metなどがあげられる。このように, 植物種によって含まれるアミノ酸に大きな差が見られたが, これらの差はそれぞれのサンプルの有機物含量に影響を受けているものと考えられる。

また, 有機物残渣含有物の加水分解性アミノ酸含量は, A層で特に低く, A0層の1/7~1/5, 最も多かったエゾシカ糞の1/10ほどであった。A層は土壌粒子を多く含み, 有機物が他のものに比べて低いためと考えられる。また, ミミズの糞は, エゾシカの糞の1/4ほどであった。ミミズはリターのみならず土壌をも食するため, 低かったと思われる。また, これら有機物残渣含有物のアミノ酸含量も, サンプルの有機物含量にも影響を受けて大きく異なってい

表1 植物, 土壌における加水分解性アミノ酸の各種含量

	加水分解性アミノ酸含量 (μM g <sup>-1</sup> )																
	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Total
ミズナラ	70.3	33.1	142.2	101.8	79.5	17.3	34.5	64.7	44.0	12.4	33.5	88.6	56.6	42.4	19.1	47.8	887.8
イタヤカエデ	51.5	24.5	75.0	73.0	56.0	10.5	25.3	46.8	28.2	8.3	25.1	45.0	40.7	31.6	13.6	33.3	588.2
ハルニレ	56.7	28.6	106.6	107.4	65.5	12.4	27.9	51.7	33.7	7.0	28.2	79.2	47.5	35.7	16.6	38.5	743.2
ハリギリ	65.5	32.3	122.9	19.9	86.2	76.5	14.0	29.1	59.0	38.8	11.8	30.3	69.9	52.5	38.6	18.3	765.5
クマイザサ(月浦)	87.1	38.3	82.1	87.3	94.9	15.6	34.1	70.9	50.4	15.2	36.7	92.5	51.7	47.3	21.2	48.3	873.6
クマイザサ(野幌)	87.0	36.0	96.7	79.0	82.1	17.3	28.3	61.3	45.6	13.5	35.9	81.0	62.1	41.4	20.2	46.4	833.8
A0表層	51.2	24.4	59.3	59.0	61.2	8.0	23.6	44.7	21.2	6.3	22.6	35.1	46.5	33.4	11.7	30.6	539.0
A0下層	41.0	15.7	44.7	41.7	50.8	6.3	16.6	29.8	13.5	3.4	15.0	29.5	38.3	24.2	7.5	22.6	400.4
A層	7.6	2.8	8.8	7.4	23.4	1.0	2.4	4.6	1.6	0.2	2.2	5.2	7.0	4.2	0.6	3.6	82.5
エゾシカ糞	86.6	36.4	92.3	95.4	114.6	12.7	36.8	65.0	24.3	6.7	33.6	59.8	66.2	51.1	19.8	46.7	847.9
ミミズ糞	19.3	6.9	23.3	19.3	37.0	4.0	7.5	12.1	8.1	2.0	6.4	15.8	19.5	12.6	3.5	11.6	208.8

たものと考えられた。

含量ではサンプルによって、各種アミノ酸に大きな違いが見られたが、アミノ酸組成（図1、2）は含量が内包していた有機物含量による影響が小さいため、似ている点、および相違点が含量に比べ明瞭であった。まず、植物葉中の加水分解性アミノ酸は、Arg, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Thr, Tyr, Val など多くのアミノ酸において組成割合が似ており、組成%が非常に近い値であった（図1）。逆に、Ala, Asp, Glu, Pro については、種間差が大きかった。特に Asp と Glu はミズナラ、イタヤカエデ、ハルニレ、ハリギリといった木本に比べ、草本のクマイザサで最も低い値となっていた。Sorimachi (1999) は、脊椎動物における加水分解性アミノ酸組成比の類似性について述べているが、植物でも同様の類似性が見られる可能性が示唆される。有機物残渣含有物の加水分解性アミノ酸組成は、Ala, Arg, Asp, His, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Tyr, でやはり組成が似ており、組成%も近い値となっていた（図2）。また、特に Gly や Leu ではサンプルによる差が非常に大きくなっており、Gly はA層で突出して大きい割合を示した。

さらに、植物葉と有機物残渣含有物とのアミノ酸組成の違いから、次のような特徴がみとめられた。それは、植物葉で組成割合が9–16%ほどと高かった Asp, Glu が、有機物残渣含有物では8–12%ほどに低下し、逆に植物葉で10%前後だった Gly は有機物残渣含有物で12–33%ほどに増加していた。同様に、Pro は7–11%ほどだったのが8%以下に低下、Ser は6–7%だったのが8–10%に増加していた。Glu は分解に従ってアミノ酸組成割合が減少し、逆に Gly は分解に従って組成割合が増加する、という傾向は、リターバックを用いた有機物分解実験でも示されている（Tremblay and Benner 2006, 保原ら 未発表）。そのため、生物分解を含めた有機物の

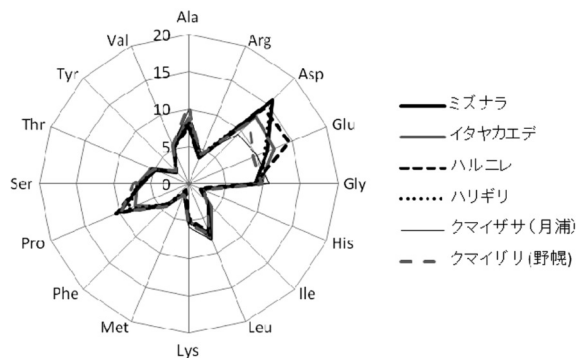


図1 各種植物生葉における各種アミノ酸の割合（%）。

続成作用の一つの象徴的な傾向であることが示唆される。

クラスター解析の結果は（図3）、アミノ酸組成の類似度が、植物葉とその分解物とで明瞭に分かれることを示していた。すなわち、植物葉のアミノ酸組成は、種による違いはあったが、類似度という点においては有機物残渣含有物と一線を画していた。例えば、植物葉の中では、樹木であるミズナラ、ハリギリ、ハルニレ、イタヤカエデと、草本であるクマイザサとが明瞭な違いがあったものの、有機物残渣含有物とは同じクラスターに入ることはなかった。産地の異なるクマイザサは産地の違いによる僅かな組成比の違いに影響されず、クラスターの距離的には非常に近い関係となった。残渣含有物に関しては、A0層とエゾシカ糞が同じクラスター、ミミズ糞がその外のクラスター、さらにA層がその外のクラスターと、有機物の分解程度とほぼリンクする形で、アミノ酸組成のクラスターが形成されていた。このことは、有機物の分解に従い、アミノ酸組成が一定方向に収斂していることを示唆している。これは、丸本ら（1974）や荻内ら（2000）が示した、分解産物へのアミノ酸組成を通した微生物関与の傾向とも

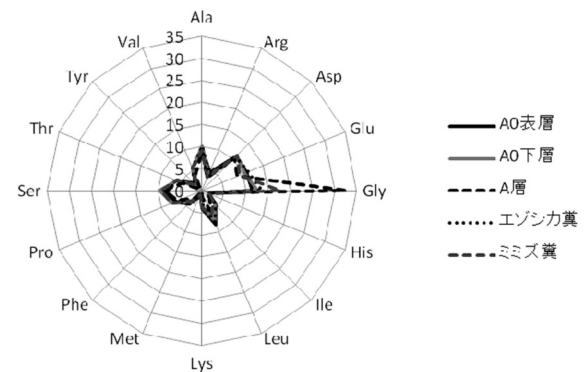


図2 A0層、A層、および生物糞の各種アミノ酸の割合（%）。

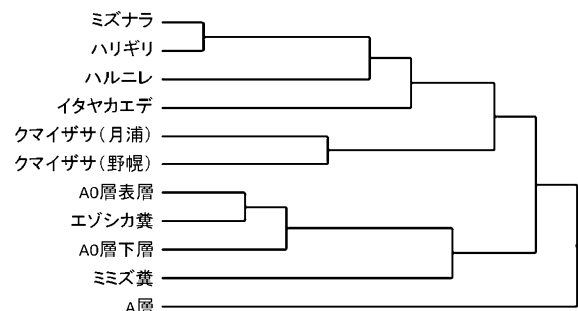


図3 植物葉および有機物残渣含有物のアミノ酸組成に基づいたデンドログラム。横軸の長さは各クラスターの距離を表す。

酷似する。

A 0 層は、ほぼその直上の植物の生産物および分解物により構成されており、土壌粒子は極めて少ない。にもかかわらず、植物葉との類似性よりも、むしろ土壌との類似性がみとめられている。このことは、分解を経ていくと、各種多様な植物の葉の有機物組成はその起源にかかわらず異なる有機物へと変化し、一方で分解物同士は非常に似た性質を持つようになるということを示唆している。

こうした、起源にかかわらず似た性質を分解産物を持つということは、アミノ酸以外の分析例からも示唆されつつある。例えば、有機物が分解とともに最終的な分解を担うバクテリアなどの生物体の体物質構造に近似してくることは、NMR などを用いた、様々な生化学的分析からも示唆されつつある(森泉, 松永 2009)。また、異なる有機物を発端とした土壌中の分解過程で、抽出可能な有機物の分子量サイズが一山型に収斂するはたらくもみとめられてきている(Matsumoto et al. 2000, 岩城 2011)。さらに、既往の我々の研究では、生物体内の分解においても、バクテリアをはじめとする微生物体の関与が示唆されており(白鳥ら 2011)、様々な系の分解過程において、こうした起源に関わらない分解産物の類似・収斂性がはたらく可能性が考えられる。

また、本研究のクラスター解析の結果は、加水分解性アミノ酸組成比を体系化して表せる事を示している。すなわち、個々のアミノ酸組成比のみに着目した場合、個々のサンプルのアミノ酸組成比の差は僅か数%であるため、測定時の誤差の影響も加味すると総体として組成が類似しているのか、相い違がっているかの判断が付きにくい。それに対し、クラスター解析では、類似、相違が、明確に距離関係として示され、判断が付きやすい。こうした明瞭な点はクラスター解析の特性であり、これまではこうした分解産物の生化学的変化には用いられてこなかったが、今後こうしたアミノ酸のような多数の構成要素を持つ有機物の変化を明らかにする上で非常に有用であることが示された。

本研究では、様々な有機物のアミノ酸組成が分解に従い一定の法則で変化することを、起源物質と分解物との違いから示唆してきたが、このことはそれぞれの葉についてのさらに詳細な時間的変化を検討することでよりさらに明確に解析されると思われる。それゆえ、本研究で不十分な、多点でのサンプリング、各植物葉の異なる分解段階の有機物残渣、などを用いて、本研究で有用と判断されたアミノ酸分析・クラスター解析を適用することにより、有機

物分解に従ったアミノ酸の類似性、相違性に関する更なる知見が見いだせるものと期待される。

## 結 論

本研究から得られる結論は、主に以下の3点にまとめられる。

- ・加水分解性アミノ酸の、植物葉およびその分解残渣含有物は、クラスター解析上、明瞭に異なっており、植物葉が裁断されただけではない、別の続成作用が分解産物の構造決定に影響することが示唆された。
- ・この結果は、有機物分解過程において、分解産物のアミノ酸組成は徐々に似た構成となり、同一のアミノ酸組成比へと収斂してゆく可能性が示唆され、それには微生物が関与することが示唆された。
- ・それらの結果からクラスター解析を用い、樹形図を作成することは、物質の類似性及び分解物の由来となる有機物を体系的に理解する上で重要な役割を果たす可能性が示された。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、酪農学園大学の井上博紀准教授、岩野英知准教授、加藤勲特任教授、松中照夫教授、横田博教授からご協力をいただいた。また本研究は、文科省科学研究費補助金(課題番号21710014, 代表:保原 達)ならびに平成21年度酪農学園大学(短期大学部)共同研究からの助成などを用いて行われた。

## 引用文献

- Berg, B., Clougherty, C. (2004) 森林生態系の落葉分解と腐植形成. 大園享司訳. シュリンプガー・フェアラーク東京.
- Friedel, J.K., Scheller, E. (2002) Composition of hydrolysable amino acids in soil organic matter and soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 315-325.
- 船山信次 (2009) アミノ酸-タンパク質と生命活動の化学. 東京電機大学出版局.
- 岩城侑平 (2011) ミズナラ葉の分解過程における溶存態有機物の分子量変化. 酪農学園大学環境システム学部卒業論文.
- 科学技術・学術審議会 (2010) 日本食品標準成分表 準拠アミノ酸成分表 2010. 蔦友印刷, 242 pp.
- 丸山卓哉, 古川兼介, 吉田 堯, 甲斐秀昭, 山田芳雄, 原田登五郎 (1974) 土壌の易分解有機物に対する微生物体およびその細胞壁の寄与につい

- て (第1報) ライグラスの分解に伴う土壌有機体窒素のアミノ酸およびアミノ糖化合物の動向. 日本土壌肥科学雑誌 45, 23-28.
- 森泉美穂子, 松永俊朗 (2009) 土壌の有機態窒素の化学形態. 土壌肥料科学雑誌 80, 304-309.
- 荻内謙吾, 中嶋直子, 阿江教治, 松本真吾 (2000) リン酸緩衝液抽出物中に含まれる有機態窒素のアミノ酸組成. 土壌肥料科学雑誌 71, 385-387.
- 白鳥聖也, 保原 達, 泉 賢一 (2011) 牛の消化過程における食物中アミノ酸組成の変化. 酪農学園大学紀要 36, 53-58.
- Sorimachi, K. (1999) Evolutionary changes reflected by the cellular amino acid Composition. *Amino Acid* 17, 207-226.
- Sowden, F.J., Chen, Y., and Schnitzer, M. (1977) The nitrogen distribution in soils formed under widely differing climatic conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 41, 1524-1526.
- Tremblay, L., Benner, R. (2006) Microbial contributions to N-immobilization and organic matter preservation in decaying plant detritus. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 133-146.

Tsutsuki, K., and Kuwatsuka, S (1978) Chemical studies on soil humic acid. III. Nitrogen distribution in humic acid. *Soil Science and Plant Nutrition* 24, 561-570.

山下 貴, 秋谷達司 (1963) 土壌加水分解物中のアミノ酸組成. 土壌肥料科学雑誌 34, 255-258.

## 要 旨

分解に伴う、天然有機物のアミノ酸組成変化について明らかにするため、森林生態系において、生態系で生産される主要な天然有機物である植物葉と、土壌A 0 層、A 層をはじめとする有機物分解残渣含有物を採取し、その加水分解性アミノ酸組成比を分析し、類似性・収斂性などについて解析を行った。その結果、採取した5種の植物と、植物の分解残渣含有物（リターA 0 層、土壌A 層、生物糞）とは異なったアミノ酸組成を示していた。アミノ酸組成をクラスター解析したところ、植物葉と分解残渣含有物は明瞭に別のクラスターに分類され、これらが明瞭に異なるアミノ酸組成を持つこと、分解産物は分解段階に応じた類似性があることが示された。こうした結果は、有機物の分解において、生化学的特性が徐々に似たものとなり、収斂してゆくことを示唆している。

## Summary

In order to elucidate changes in amino acid composition of natural organic matters through decomposition, we sampled plant leaves, the major organic products in forest ecosystems, and detritus containing decomposed organic matter, such as litter O layer, mineral soil A layer, and faces, analyzed amino acid composition, and discussed about their similarities and convergences. Plant leaves showed clearly different composition of amino acid from detritus. Cluster analysis indicated that plant leaves were categorized in the different cluster from detritus, suggesting that detritus derived from various sources can have similarities in biochemical characteristics, in spite of varieties in chemical composition. These results suggest that decomposed organic matter comes to have similarities in chemical characteristics during decomposition process, and that they also have convergence in chemical characteristics.